روشهای آزمایشگاهی تشخیص انواع پروتئینوری در بیماران کلیوی

گردآوری از: فرنگیس نجفی*

مقدمه:

بیماریهای کلیوی گروه بزرگی از بیماریهای مرتبط با ساختار و عملکرد کلیه را شامل می شوند. از آنجا که این بیماریها در مراحل اولیه با علائم مبهم و نامشخص همراه می باشند، لذا به راحتی نادیده گرفته شده و اغلب تشخیص پس از پیشرفت بیماری صورت می گیرد. با توجه به اینکه یکی از مهمترین علائم پاتوفیزیولوژیکی بیماریهای کلیه وجود مقادیر غیر طبیعی پروتئین در ادرار می باشد، می توان با استفاده از روشهای مختلف آن را تشخیص داد. گرچه ممکن است تحت شرایطی، پروتئینوری بدون اختلالات کلیوی نیز وجود داشته باشد(۱).

بحث:

پروتئینها یا از خون شامل: آلبومین، پروتئینهای انتقالی، لیزوزیم و ایمونوگلوبولینها و یا از سلولهای توبولی آسیب دیده مانند: تام هورسفال، آنزیمهای لیزوزومی و آلکالن فسفاتاز، منشأ گرفته و وارد ادرار می شوند (۲). پروتئینها بر اساس وزن و اندازه مولکولی، بار الکتریکی و ..... دسته بندی می شوند که بحث راجع به تمام آنها در این مقوله نمی گنجد به همین دلیل فقط به دسته بندی بر اساس وزن مولکولی بسنده می گردد:

۱)پروتئینهای با وزن مولکولی بالا HMW بیشتر از ۱۵۰ کیلو دالتون مانند IgM,IgG.

۲)پروتئینهای با وزن مولکولی متوسط MMW تقریباً ۷۰ کیلودالتون مانند آلبومین.

۳)پروتئینهای با وزن مولکولی پائین LMW کمتر از ۴۰ کیلو دالتون مانند زنجیره سبک ایمونوگلبولینها (۳).

در شرایط فیزیولوژیک دیواره مویرگهای گلومرولی کلیه نسبت به آب بسیار نفوذ پذیر،اما در مقابل پروتئینهای با وزن مولکولی بالا کاملاً نفوذ ناپذیر است. پروتئینهای با وزن مولکولی پائین بطور کامل و پروتئینهای با وزن مولکولی متوسط بطور جزئی از سّد گلومرولی عبور می کنند. علیرغم بازجذب پروتئینها توسط سلولهای توبولی جزئی از آلبومین و پروتئینهای با وزن مولکولی پائین از چرخه باز جذب مجدد گریخته و در ادرار ظهور می یابند(۳). میزان دفع پروتئین در ادرار افراد بزرگسال سالم۲۴± ۸۰ میلی گرم در روز است، و بیش از ۹۵ درصد افراد سالم روزانه کمتر از ۱۵۰ میلی گرم پروتئین دفع می کنند(۴).یک سوم از پروتئینوری های فیزیولوژیک مربوط به آلبومین می باشد، که پروتئین اصلی در ادرار مبتلایان به پروتئینوری وضعیتی است و بیش از دو سوم باقیمانده، گلبولینها هستند که ا ز سرم ناشی می شوند(۵).درحالت طبیعی روزانه مقادیر بسیار کمی از زنجیره سبک ایمونوگلبولینها κ (۲/۴mg) و λ (۱/۵mg) در ادرار افراد سالم دفع می شود. تقریباً ۱۰ تا ۶۰ میلی گرم از پروتئین ادراری ممکن است توسط سلولهای اپی تلیال مجاری ادراری ترشح شود (۵).

شایان ذکر است دفع مقادیر بالاتر از۳۰۰ میلی گرم پروتئین در روز الزاماً مؤید بیماری کلیوی نیست، بلکه ممکن است در پی تمرینات شدید یا ایستادن طولانی مدت نیز ظاهر شود(۲).

وقتی پروتئین غالب موجود در ادرار آلبومین باشد، پروتئینوری انتخابی نامیده می شودکه بیانگر اختلال در بار الکتریکی انتخابی غشاء گلومرولی است. بدلیل اینکه در حالت عادی آلبومین با بار الکتریکی منفی از غشاء

* کارشناس علوم آزمایشگاهی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان.

گلومرولی دارای بار الکتریکی منفی عبور نمی کند. در صورتیکه در بار الکتریکی غشاء گلومرولی اختلالی ایجاد شود آلبومینوری رخ می دهد مثلاً در نفروپاتی با تغییرات جزئی وقتی که آلبومین با پروتئینهای بزرگتر (کمپلمان، گلبولینها، لیپوپروتئینها) همراه باشد، پروتئینوری غیر انتخابی و نشانه اختلال درمنافذ غشأ گلومرولی است مثلاً در نفروپاتی مامبرانی(۳). پروتئینوری غیر انتخابی مشخصهٔ افراد مبتلا به بیماری شدید کلیوی است و در یک بررسی نشان داده شده است که مبتلایان به سندرم نفروتیک علاوه بر آلبومین، پروتئینهای با وزن مولکولی بالا (IgM,IgG) نیز دفع می کنند و افزایش میزان پروتئینهای با وزن مولکولی بالا با پاسخ به درمان نسبت عکس دارد(۳). اشکال پاتوفیزیولوژیکی پروتئینوری عبارتند از: گلومرولی، توبولی، پروتئینوری ناشی از تولید بیش از حد پروتئین و پروتئینوری بافتی که به دلیل اهمیت افتراق پروتئینوری گلومرولی و توبولی به دو نوع اول اشاره می شود(۲).

الف) پروتئینوری گلومرولی: ناشی از بهم خوردن تعادل مکانیسمهای مسئول حفظ نفوذپذیری انتخابی گلومرولها نسبت به پروتئینهای پلاسما می باشد. از پروتئینهای پلاسما عمدتاً آلبومین و گلبولینها در ادرار یافت می شوند. محدوده پروتئینوری غیر طبیعی تقریباً ۲۰۰ میلی گرم تا بیش از ۴۰ گرم در روز می باشد(۴).

ب) پروتئینوری توبولی: اولین بار در بیماران مبتلا به نارسایی های توبولی مادرزادی و همچنین در مسمومیت با فلزات سنگین توصیف شد(۱). پروتئینوری توبولی ناشی از باز جذب ناکافی پروتئینهای فیلتر شده می باشد. گرچه پروتئینوری گلومرولی و توبولی می توانند توأماً وجود داشته باشند، اما پروتئینوری توبولی معمولاً شامل پروتئینهایی با وزن مولکولی پایین مثل بتا دو میکروگلبولین می باشد که به ناحیهα وβ الکتروفورز مهاجرت می کنند. میزان ترشح پروتئین می تواند بسیار گسترده باشد، اما عموماً در محدوده ۲۰۰ میلی گرم تا ۲گرم در روز می باشد(۱). کمتر از ۱۵ درصد پروتئینهای توبولی آلبومین و باقیمانده، اجزاء اصلی آن،یعنی β_2 میکروگلبولین ، α_1 گلبولین ، γ_1گلبولین ، γ_2 گلبولینها هستند(۱).

برای تشخیص پروتئینوری از روشهای تجزیه متفاوتی استفاده می شودکه عبارتند از: Dipstick، روشهای رسوبی، توربیدیمتری و کلریمتری، ایمنوالکتروفورز روی استات سلولز، الکتروفورز روی ژل پلی اکریل آمید.

۱. Dipstick : روشی برای بررسی نیمه کمی پروتئینهای توتال است. نواری است حاوی نشانگر رنگی(برم فنل بلو) که در PH = ۳ زرد رنگ است . در PH =۵ -۷ نشانگر به آلبومین متصل شده و تغییر رنگ ایجاد می شود ،که شدت رنگ ایجاد شده به غلظت آلبومین ادرار بستگی دارد(۲). نوارهای dipstick نسبت به پروتئینهای دارای بار الکتریکی منفی مانند آلبومین با مقدار حداقل ۳۰-۲۰ میلی گرم در دسی لیتر ادرار حساس هستند، همچنین ساده ، سریع و مقرون به صرفه می باشند، از طرفی این نوارها برای تعیین گلبولینهاکه دارای بار الکتریکی مثبت می باشند مانند پروتئینهای با وزن مولکولی کم و زنجیره های سبک ایمونوگلبولینها حساسیت کمی دارند(۲). بنابر این در پروتئینوری توبولی و پروتئینوری ناشی از تولید بیش از حد پروتئین به این دلیل که آلبومین اصلی ترین پروتئین نیست ، ممکن است تست بطور کاذب منفی شود.همچنین در ادراری با PH>۸ ممکن است این نوارها پروتئینوری را بصورت کاذب مثبت نشان دهند(۵).

۲. روشهای رسوبی: روش نیمه کمی است. در این روش پروتئین ادرار با اضافه کردن اسید سولفوسالسیلیک ۵ درصد یا اسید نیتریک غلیظ شده یا حرارت و سپس اضافه کردن اسید استیک غلیظ رسوب می کند. پروتئین ادرار بر اساس میزان رسوب تقسیم بندی می شود(بدون رسوب صفر ، رسوب خیلی کدر ۴+). با این روش احتمال شناسایی ۱۰- ۵میلی گرم در دسی لیتر پروتئین ادرار که پروتئینهایی با بار الکتریکی مثبت را هم شامل می شود، وجود دارد.

در این روش وجود تولبوتامید یا مقادیر زیاد پنی سیلین نافی سیلین، آکساسیلین موجب ایجاد واکنشهای مثبت کاذب می شود. این روشها بدلیل مشکلات انجام آزمایش کمتر مورد استفاده قرار می گیرد(۱).

۳. توربیدیمتری و کلریمتری: در توربیدیمتری پروتئینها تخریب ورسوب داده می شوند. شدت کدورت ارتباط مستقیم با غلظت پروتئین دارد. در روش کلریمتری، پروتئینهای ادرار پس از رسوب مجدداً تجزیه شده و با یک نشانگر مخلوط می شود. شدت جذب رنگ محلول ارتباط مستقیم با غلظت پروتئین دارد. در این روش نیز وجود تولبوتامید و..... موجب ایجاد واکنشهای مثبت کاذب می شود. این روش حساسیت کمی برای تشخیص پروتئینهایی غیر از آلبومین دارد(۱).

با توجه به اینکه هیچ یک از روشهای فوق توانایی تفکیک اجزاء پروتئینی را ندارند، توصیه می شود از روشهای الکتروفورزی استفاده شود. در بیمارانی که پروتئین توتال بالا دارند تعیین الگوی پروتئینهای دفعی توسط الکتروفورز اطلاعات مفیدی را در رابطه با منشاء پروتئینوری می دهد.

❑ اهمیت تشخیص منشاء پروتئینوری توبولی از گلومرولی : همانگونه که قبلاً ذکر شد، پروتئینهای ادراری در انواع اختلالات کلیوی ظاهر می شوند. افتراق پروتئینوری توبولی از گلومرولی(پروتئینهایی با وزن مولکولی پایین و بالا در ادرار) در بیماریهای کلیوی اطلاعات پرباری برای تشخیص، درمان، پیش آگهی در اختیار می گذارد. برای پیش بینی آسیب توبولی، بیوپسی کلیه به تنهایی کافی نیست، چون بیوپسی کلیه علاوه بر تهاجمی بودن فقط نمونهٔ کوچکی از بافت کلیه را نشان می دهد. پس از بررسی ارتباط بین اجزای پروتئینی ادرار و اختلالات کلیوی مشخص شد که اگر علاوه بر آلبومین یک شاخص توبولی (α_1 میکروگلبولین رتینول باندینگ پروتئین، بتا دو میکروگلبولین) هم داشته باشیم، می توانیم گلومرولوپاتی ها را از نفروپاتی توبولی بینابینی تفکیک دهیم. اندازه گیری پروتئینهای خاص در ادرار مانند β_2 میکروگلوبین و لیزوزیم در تشخیص اولیه اختلالات توبولی بینابینی مورد استفاده قرار می گیرد. افزایش β_2 میکروگلوبین در ادرار، مقدمه شروع نارسایی کلیه در دریافت کنندگان آمینوگلیکوزیدازها، افرادی که بطور مداوم در معرض فلزات سنگین هستند یا افراد مبتلا به نفروپاتی آندمیک بالکان می باشد(۶).

شاردین و استاتیوس اختلاف آشکاری را در میزان بتا دو میکروگلبولین مترشحه در ادرار ۲۴ساعته افراد مبتلا به عفونت مجاری ادراری فوقانی و تحتانی و افراد غیرعفونی گزارش کردند. افزایش ترشح ادراری بتا دو میکروگلبولین درتشخیص رد پیوند در بیمارانی که پیوند کلیه شده اند، سودمند نیست چون ممکن است نارسایی حاد کلیه پس از پیوند به دلایلی غیر از رد پیوند نیزدیده شود(۱).

۴. ایمنوالکتروفورز بر روی استات سلولز: در این روش، ادرار ۱۰تا ۲۰۰ بار تغلیظ و پس از نمونه گذاری روی استات سلولز، پروتئینهای مورد نظر با توجه به بار الکتریکی توسط الکتروفورز جدا می شوند. اجزای جداشده بر روی استات سلولز توسط محلول نقره کلوئیدی با حساسیت بالا رنگ آمیزی وسپس استات سلولز توسط دانسیتومتر اسکن شده و نموداری از تراکم باندهای پروتئینی ویژه رسم می گردد. این روش می تواند برای آنالیز ادرار با غلظت پروتئین پایین (منفی توسط dipstick) استفاده شود، چون حداقل حساسیت تعیین۲/۵ میلی گرم در لیتر است(۷). این روش برای ارزیابی بیمارانی با پروتئینوری صرفاً گلومرولی یا توبولی روشی سودمند است، هرچند اغلب بیماران ترکیبی از هر دو را نشان می دهند. علاوه بر این ممکن است افتراق پیک منوکلونال از پلی کلونال زنجیره سبک ادراری مشکل باشد. چون بر عکس الکتروفورز پروتئینهای سرم، زنجیره سبک مونوکلونال ادراری عموماً یک باند پهن ایجاد می کند(۷).

الکتروفورز روی ژل پلی اکریل آمید: در این روش نیز پروتئینهای مورد نظر توسط الکتروفورز عمودی و

براساس فقط وزن مولکولی و نه بار الکتریکی جدا می شوند. در روش SDS- PAGE حضور پروتئینهای با وزن مولکولی بیش از ۶۶کیلودالتون مانند آلبومین، نشانگر تغییراتی در سایز و یا بار الکتریکی انتخابی گلومرولها است و حضور پروتئینهای با وزن مولکولی پایین (زنجیره های سبک κ و λ) کمتر از۶۶ کیلودالتون، مشخص کننده تغییراتی در جذب مجدد توبولی است که ناشی از تولید بیش از اندازه پروتئین و یا آسیب توبولی است. پس از انجام آزمایش، ژل توسط کوماسی برلیانت بلو یا نیترات نقره رنگ آمیزی شده و باند های جداشده ابتدا با چشم تفسیر شده و سپس با اسکن و دانسیتومتری اندازه گیری و تأیید می شوند (۶). درآخرین تحقیقات، پس از SDS-PAGE از وسترن بلاتینگ برای شناسایی پروتئین مورد نظر بهره گرفته شده است(۸).

تغلیظ نمونه های ادراری قبل از جداسازی نشان می دهد که تعدادی از پروتئینها با وزن مولکولی پایین از دست می رود به همین دلیل یک روش حساس برای جداسازی نمونه های ادراری تغلیظ نشده، با استفاده از سیستم سریع اتوماتیکی، با گرادیان غلظتی ژل پلی - اکریل آمید صورت می گیرد. سپس ژل رنگ آمیزی شده و با استفاده ازسیستم آنالیزکامپیوتری از آن یک تصویر دیجیتال بدست می آید. این روش، برای تشخیص بیماران کلیوی با پروتئینوری روش سودمندی می باشد(۹).

❑ اجزاء پروتئینی دیگری نیز در ادرار بیماران کلیوی قابل تشخیص است

بتا ان استیل گلوکز آمینیداز (NAG)، آنزیم هیدرولیتیکی است که روی اجزاء گلیکوزیلی عمل می کند و در بافتهای زیادی وجود دارد. در کلیه بیشتر در جزء لیزوزومی و به مقدار کمتر درجزء میکروزومی سلولهای اپی تلیال توبولی وجود دارد. غلظت آن در بافت کلیه بسیار بیشتر از مجاری ادراری است و بخاطر بزرگی اندازه مولکولی در گلومرولها تصفیه نمی شود. بنابراین NAG ادراری اصولاً توبولی است مگر وقتی که پروتئینوری گلومرولی وجود داشته باشد، که در آن صورت NAG در اثر فیلتراسیون در ادرار ظاهر می شود. مقدار دفع آن در زنان و مردان مشابه است به همین دلیل بطور گسترده ای در ارزیابی نفروتوکسیسیتی دارویی، دفع پیوند کلیه، انواع اختلالات کلیوی استفاده می شود. افزایشNAG در ادرار دریافت کنندگان پیوند کلیه مهمترین یافته آزمایشگاهی است ونسبت به سایر یافته های آزمایشگاهی و بالینی رد حاد ارجحیت دارد. بنابراین اندازه گیری NAG ادراری در دریافت کنندگان پیوندِ تحت دیالیز قابل اعتماد نمی باشد، بدلیل اینکه فیلتراسیون اضافی در غیاب آسیب کلیوی نیز موجب افزایش میزان آن می شود. این مسئله در بیمارانی که سیکلوسپورین A دریافت می کنند هم مشکل ساز می شود، چون این دارو بعنوان ایمنوساپرسیو اصلی بعد از پیوند استفاده شده و یک ماده نفروتوکسیک است که قادر است به لوله پروگسیمال و سلولهای ضخیم لوله هنله آسیب برساند و باعث افزایش NAG گردد (۹).

بتا دو میکروگلبولین، با وزن مولکولی ۸ /۱۱کیلو دالتون در افراد سالم توسط گلومرولها تصفیه شده و در لوله های پروگسیمال بطورگسترده ای بازجذب می شود سنجش و اندازه گیری توسط روش رادیوایمنواسی می باشد. سطح آن در سرم افراد طبیعی۱/۱تا ۷/۲ میلی گرم در میلی لیتر است. دفع طبیعی ادراری آن کمتر از ۳۷۰ میکروگرم در روز است. عدم پایداری بتا دو میکروگلبولین در شرایطی از قبیل (دمای ۲۵ درجه اتاق، حضور آنزیمهای پروتئولیتیک و PH<۵/۵) اندازه گیری آنرا مشکل می کند. جهت اندازه گیری بتا دو میکروگلبولین باید PH ادراربیش از ۶ باشد و رسوب ادرارجدا شود(۹).

ترشح زنجیره سبک ایمنوگلبولینها (بنس جونس)، در افراد طبیعی از۱تا۷ میلی گرم در روز متغیر است که هم بصورت منومر (۲۲کیلودالتون) و هم دیمر

(۴۴کیلو دالتون) با شارژ متفاوت حضور دارند. منومرها براحتی تصفیه شده در حالیکه تنها ده درصد دایمرها در فیلتره گلومرولی ظاهر می شوند. وجود زنجیره سبک اضافی در ادرار مؤید افزایش غلظت پلاسمایی زنجیره سبک، ناشی از تولید زیاده از حد است که معمولاً با اختلالات پرولیفراتیو همراه است. اساس تشخیص پروتئین بنس جونس حرارت دادن ادرار است. زنجیره های سبک مونو کلونال اکثراً بین ۴۰تا۶۰ درجه سانتی گراد رسوب می کنند و تقریباً در۱۰۰درجه سانتیگراد تجزیه می شوند. اما با روش حرارت دادن حداقل محدوده اندازه گیری ۳۰ میلی گرم در دسی لیتر است و غلظت پایین تر پروتئینهای مونوکلونال موجب ایجاد موارد منفی کاذب می گردد. افزایش زنجیره سبک پلی کلونال و دناتوره شدن زنجیره های سبک پلی کلونال در طول نگهداری ادرار موجب افزایش موارد مثبت کاذب می شود(۱). به دلیل این محدودیتها برای شناسایی زنجیره های سبک منوکلونال روش ایمنوالکتروفورز ادرار پیشنهاد می شود. با استفاده از آنتی سرمهای زنجیـــره های سبک κ و λ ،تعیین هویت زنجیره های سبک منوکـــلونال حتی در حضور مقادیر زیاد دیگر پروتئینها امکانپذیر می گردد.

نتیجه گیری:

ترشح غیر طبیعی پروتئین در ادرار ، مشخصه همه بیماری های گلومرولی است اعم از اینکه همراه سندرم نفروتیک باشد یا نباشد.افزایش نفوذ پذیری دیواره مویرگهای گلومرولی از نقطه نظر اندازه وبار الکتریکی منجر به عبور گلومرولی آلبومین و پروتئینهای با وزن مولکولی بالا می شود که معمولاً از سدّ گلومرولی عبور نمی کنند. همچنین اختلال در باز جذب کلیه پروتئینها بویژه پروتئینهای با وزن مولکولی بالا توسط سلولهای اپی تلیالی توبولی می باشد که به علل مختلفی است. مقدار و وزن مولکولی پروتئینهایی که به توبول می رسند همراه با افزایش شدت آسیب ساختمانی به دیواره مویرگهای گلومرولی، افزایش می یابد که در نتیجه آن خاصیت عبور انتخابی پروتئینها از سدّ گلومرولی کاهش می یابد. با ادغام روشهای جداسازی پروتئینهای ادراری و سایر روشهای پاراکلینیکی مانند بیوپسی می توان اطلاعات دقیق تری راجع به نوع و مرحله بیماری در اختیار متخصصین قرار داد.

منابع:

1-Bernner b.m & Rector f.c The kidney . **Saunders**. 1991 Vol: 1; fourth edition p: 940-947

2-Kunin C .M ,Detection , prevention and management of urinary tract infections , Fourth edition , 1987, lea&Febiger p:62-64 .

3-D'Amico.Giuseppe & Bazzi.claudio , **Pathophysiology of proteinuria , Kidney international** 2003 .Vol : 63 issue 3 ; P:809-825

4- massry s.G & Glassock R.j .**Text book of nephrology** ,William&wilkins , Vol:1 p:530-534 . 1989

5- massry s.G& Glassock R.j .**Text book of nephrology** ,William&wilkins , Vol:2 p:1610-1618 . 1989

6- Bazzi c, et al .characterization of proteinuria in primary Glomerulonephritides. SDS-PAGE patterns. **American journal of kidney diseases** Vol: 29. No 1 (January) .1997 p: 27-35

7-Machii R, et al. urinary protein fraction in healthy subjects using cellulose acetate membrane Electrophoresis followed by colloidal silver staining. **J clin Lab Anal** 2004; 18:231-236

8- Niemir z .l, et al .The in situ expression of interleukin_8 in the normal human kidney. **American journal of kidney diseases**, Vol 43, No 6, 2004: pp: 983-998

9-Behets ,Geert J & DeBore, Marc E. SDS-Electrophoresis of Unconcentrated urine samples using a semi-automatic method. **Renal failure**, vol 21(3&4) 1999, P: 409-412

10-massry s.G & Glassock R.j .**Text book of nephrology** ,William&wilkins , Vol:2 p:1613-1618 . 1989